

动 物 学 研 究 1998, 19 (6): 473～481 CN 53-1040/Q ISSN 0254-5853
Zoological Research



473-481 Q753 Q523

生物钟基因 *period* 的分子生物学*

郑向忠[①②] 张亚平[①] 朱定良[②] 庚镇城[②]

(①中国科学院昆明动物研究所细胞与分子进化开放研究实验室 昆明 650223)

(②复旦大学遗传学研究所 上海 200433)

摘 要 生物过程的昼夜节律是所有真核生物和部分原核生物的基本特征。自从 *period* 基因被克隆以后，生物钟基因的研究已经取得长足的进展。生物钟的 4 个基本部件如何调控昼夜节律的分子机制已被较详细地阐明，这是遗传学和基因组学相结合的一个非凡成就。本文回顾了 *per* 基因及生物钟分子机制的研究历史，旨在为人类复杂行为的研究提供一条思路。

关键词 生物钟，*period* (*per*) 基因 分子机制
中图分类号 Q71，Q753

地球的自转和公转产生了周而复始的昼夜更替和季节变换，与之相应，生物的体内生理活动和外在行为也表现出同样的周期节律特征 (Pittendrigh, 1993; Takahashi, 1995)。从单细胞的分裂生殖到植物的光合作用，动物的激素分泌和繁殖，都有其节律的存在。生物过程的昼夜节律是所有真核生物和部分原核生物的基本特征 (Takahashi, 1995)，即使在黑暗中，生物体内一个自主的钟摆也调控着各种生理活动的近昼夜节律。那么是否所有的生物都有类似的时钟控制机制？或者都有相似的钟的“齿轮”？自从 Konopka 等 (1971) 报道果蝇昼夜节律突变型以来，生物钟基因的研究已经取得了长足的进展。已有多个与生物钟有关的基因被克隆和测序 (Dunlap, 1996)。果蝇 *period* (*per*) 基因是最早被克隆的生物钟基因，这个基因的突变使得果蝇的化蛹和昼夜活动节律异常，把正常的基因导入突变体，则可以恢复其正常的节律。这一发现使人们相信，即使是复杂的行为，也可能有其简单的遗传基础。此后经过 10 多年的努力，生物钟的多个“齿轮”相继被发现。最近，生物钟的分子机制已经被较详细地阐明。这是遗传学和基因组学相结合的一个非凡成就。回顾 *per* 基因及生物钟分子机制的研究历史，对于人类复杂行为的研究具有重要的借鉴意义。

1 *per* 基因的基本结构

利用 EMS 诱变，Konopka 等 1971 年筛选出了果蝇的 per^{s} (19 h)、per^{L1} (28 h) 和 per^{01} (无节律) 3 个生物钟突变型，三者都定位于多线染色体 3B1-2 的位置，即 X 染色体的顶端。1984 年，Rockefeller 大学和 Brandeis 大学的两个研究小组分别克隆了 *per* 基

* 国家自然科学基金和中国科学院昆明动物研究所细胞与分子进化开放研究实验室资助项目
本文 1998-06-19 收到，1998-10-07 修回

因。后经过多项研究发现 *per* 基因的转录产物为一 4.5 kb 的 mRNA（Kyriacou，1990）。随后，*Drosophila melanogaster*、*D. pseudoobscura*、*D. virilis* 和 *D. yakuba* 4 种果蝇 *per* 基因的序列相继被测定（Jackson 等，1986；Citri 等，1987；Colot 等，1988；Thackeray 等，1990）。在 *D. melanogaster* 中，*per* 基因总长约 13 kb，有 8 个外显子，包括 1 218 个氨基酸的开放阅读框架。其中第 1 个外显子和第 8 个外显子的一部分不编码蛋白质（图 1）。这个基因可能产生 3 种转录产物，图 1 所示的结构产生最主要的转录产物，另 2 个转录产物是通过 3′端不同的拼接产生的，它们在细胞中的浓度较低，但是相应的转化实验证明三者都可以重建突变体的节律（Citri 等，1987）。

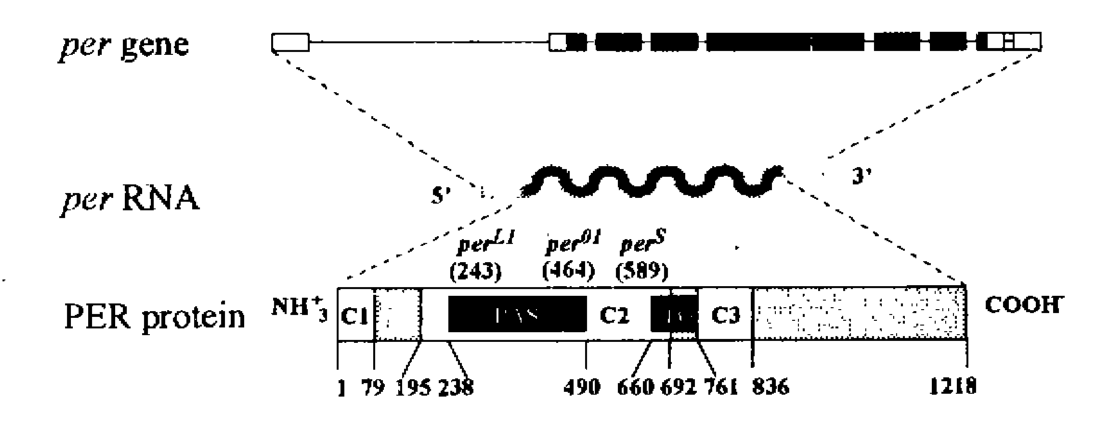


图 1 *per* 基因和 PER 蛋白结构示意图（引自 Hardin 等，1995）

Fig.1 Structure and organization of the *per* gene and its product (from Hardin *et al*., 1995)

per 基因有 8 个外显子，分为不翻译（白色框）和翻译（黑色框）两部分。3′端的不同剪切方式（折线表示）产生另外 2 种转录产物。曲线为 *per* mRNA。PER 蛋白总长 1 218 个氨基酸，C1、C2 和 C3（白框表示）为双翅目和鳞翅目之间保守的序列。黑框分别代表 PAS 域和 Thr－Gly 区段。数字表示氨基酸位置 [*per* consists of eight exons: white boxes, untranslated; black boxes, translated. Twisted black line is *per* mRNA. C1, C2 and C3 (white boxes), are conserved between Dipterans and Lepidopterans. Black boxes define the PAS domain and Thr-Gly region. The amino acid numbers indicate the limits and position].

对上述 4 种果蝇 *per* 的序列进行比较后发现，*per* 可分为多个不同程度保守和变异的区段（Colot 等，1988；Thackeray 等，1990），最保守的区域是从第 3 个外显子末端到第 5 个外显子起始部分之间约 270 个氨基酸的部分（图 1）。这一区段又与果蝇 *D. melanogaster* 的 *single-minded*（*sim*）基因，以及哺乳类的芳香烃核转移基因（*ARNT*）有相当大的序列相似性，取这 3 个基因的第 1 个字母，这一同源区段被称为 PAS 结构域（PAS domain），简称 PAS 域（Nambu 等，1991）。在 PAS 域里有两个 51 个氨基酸的重复片段，它们有可能协调 PER 蛋白与另一个生物钟基因产物之间的二联化作用（Kyriacou，1994）。

3 个 *per* 突变体都是由单核苷酸突变引起的。per^{01} 是由 Gln 突变成 UAG 终止密码，导致产生一段约 400 个氨基酸的未成熟肽段，per^{s} 是 Ser 突变成 Asn，per^{L1} 是 Val 突变成 Asp（Baylies 等，1987；Yu 等，1987a）。per^{01} 和 per^{L1} 突变都发生在 PAS 域内，per^{s} 突变发生于 PAS 域的下游，大致位置如图 1 所示。最近的一些研究表明这个位置附近的许多

氨基酸替换都可造成短周期突变（Hardin 等，1995）。

与 PAS 域不同，*per* 基因约 30%区段在种间高度分化，以至于难以排序（Colot 等，1988)。最为显著的一个特征是有一连串的 Thr－Gly 重复序列。Thr－Gly 重复区段在种间、种内都存在丰富的变异，可能具有重要的生物学意义（见下文)。由于鼠类粘蛋白具有与多糖结合的 Ser－Gly 区段，而 Thy 和 Ser 为相似的氨基酸，所以 PER 曾被认为是一种蛋白多糖，通过它进行细胞间的信号传递，从而调节昼夜节律（Shin 等，1985；Kyriacou，1990)。后来的研究证明 PER 不是蛋白多糖，而是转录调节蛋白（Kyriacou，1990；Hardin 等，1995)。

2　PAS 域在物种间高度保守

PER 和其他 3 个转录因子（ARNT，AhR，SIM）共有一个 PAS 域（Nambu 等，1991；Huang 等，1993)。但与这 3 个转录因子不同的是，PER 没有基－螺旋－环－螺旋(basic-Helix-Loop-Helix，bHLH）结构，也没有 DNA 结合活力（Huang 等，1993)。后来发现果蝇的另一个节律基因（*timeless*，*tim*）与 *per* 是通过各自产物的异型结合，进入核内调节 *per* 转录的（Sehgal 等，1994；Vosshall 等，1994；Gekakis 等，1995；Sehgal 等，1995)。但是 TIM 蛋白没有 PAS 域，也没有 DNA 结合活力（Lee 等，1996)。因此 PER－TIM 如何调节 *per* 的转录曾一度使人们迷惑不解（Hardin 等，1995；Lee 等，1996)。有证据表明 TIM 蛋白的一小片段结合到 PER 的 PAS 域（Lee 等，1996)，但也有可能是 PER 通过其 PAS 域与另一个含有 bHLH－PAS 域的生物钟基因结合进行反馈调节(Huang 等，1993；Hao 等，1997；King 等，1997)。现已经在 10 多个转录因子或生物钟基因中发现 PAS 域（Barinaga，1997)，由此可以推断，PAS 域在物种间（至少是在 *per* 基因内）应该是高度保守的。

在不同物种间比较 *per* 基因各个区段的变异程度，有利于揭示 *per* 如何进化以适应不同物种同样的昼夜节律活动。基于 PCR 手段，在多个果蝇类群（Colot 等，1988；Thackeray 等，1990；Costa 等，1991；Wheeler 等，1991；Peixoto 等，1992，1993；Nielson 等，1994；Kliman 等，1993；Hilton 等，1996；Wang 等，1996；Gleason 等，1997）和果蝇自然群体内（Costa 等，1992；Castiglione-Morelli 等，1995；Sawyer 等，1997)，以及其他昆虫（Nielson 等，1994；Reppert 等，1994）和哺乳类（Sun 等，1997；Tei 等，1997）中，*per* 或 *per* 的同源基因的全部或部分序列已经被测定。研究目标大都集中于 PAS 域和 Thr－Gly 重复区段。一个很明显的现象是 PAS 域在物种间高度保守。在果蝇 *D. melanogaster* 种复合体中，PAS 域在种间差异很小，几乎所有的变异都为同义氨基酸替换（Kliman 等，1993)。果蝇 *D. melanogaster* 和 *D. willistoni* 之间 PAS 域的氨基酸差异只有 4.9%。包括 PAS 域在内的多个保守区在果蝇种类之间的氨基酸序列相似度达到了 80%左右（Gleason 等，1997)，PAS 域在果蝇 *D. virilis* 和蛾（*Antheraea pernyi*）之间有 46%的序列一致（Reppert 等，1994)。果蝇 *D. melanogaster* 和哺乳类之间，PAS 域的相似度也近 50%（Sun 等，1997；Tei 等，1997)。这种保守的模式以及这个区域内的单个氨基酸替代导致果蝇昼夜节律异常的事实，说明 PAS 在节律调控中起着重要作用。因此在不同的模式动物中寻找含有 PAS 域的同源基因，将有助于人们发现新的生物钟“齿

轮"。最近几项令人振奋的研究结果表明，正是另外两个含有 bHLH－PAS 域的生物钟基因，完善了昼夜节律的调节回路。

3 Thr－Gly 区段呈现丰富的变异

与 PAS 形成鲜明对照的是 Thr－Gly 区段。这个区段在 Kyriacou 的实验室得到了广泛深入地研究（Kyriacou，1990；Thackeray 等，1990；Costa 等，1991；Wheeler 等，1991；Costa 等，1992；Peixoto 等，1992，1993；Kyriacou，1994；Nielson 等，1994；Castiglione-Morelli 等，1995；Sawyer 等，1997）。对不同种和自然群体的 Thr－Gly 区段的序列比较分析表明：（1）这一区段的长度及氨基酸组成在种间有很大变异。比如在果蝇属内，这一区段的长度变化为 19～209 个氨基酸，且氨基酸组成差异也很大（Peixoto 等，1993）；在其他昆虫内，这一区段往往很短（约 9 个氨基酸），而且组成稳定（Nielson 等，1994）；（2）果蝇 *D.melanogaster* 自然群体和实验室品系中，Thr－Gly 重复对的数目也呈现丰富的多态（Yu 等，1987a；Costa 等，1992；Castiglione-Morelli 等，1995；Sawyer 等，1997）。对 Thr－Gly 区段及上述的 PAS 域的进化分析说明，保守的 PAS 域编码物种共有的功能，如昼夜节律；而变异区则可能编码物种特有的时域行为，例如果蝇求爱歌的节律（Kyriacou 等，1986）。这种设想可能显得有些奇特，因为在分子进化领域，一般认为多变区是没有重要功能的。但是，已有一些证据表明这一区段确实具有很重要的生物学功能（Yu 等，1987b；Kyriacou，1990；Wheeler 等，1991；Costa 等，1992；Castiglione-Morelli 等，1995；Sawyer 等，1997）。用缺失 Thr－Gly 区段的 *per* 转化 per^{01} 突变体，结果出人意料：转化子的昼夜节律被恢复，而求爱歌节律却比野生型短了 20 s（Yu 等，1987b）。这说明 *per* 基因具有双重功能：Thr－Gly 区段可能控制果蝇求爱歌的节律，而不影响昼夜节律（Kyriacou，1990）。更有趣的是，求爱歌的节律似乎与 Thr－Gly 重复对的长度成反比：*D.yakuba* 有 15 对，求爱歌的节律为 80 s；*D.simulans* 有 24 对，歌节律为 35～40 s；*D.melanogaster* 有 17 和 23 对，歌节律为 55 s（Kyriacou，1990）。把 *D.simulans* 的 Thr－Gly 区段转化进 *D.melanogaster* 的 per^{01} 突变体，转化子的求爱歌节律被恢复，但唱的是 *D.simulans* 的歌（Wheeler 等，1991）。不过，还不能肯定 Thr－Gly 区段直接控制求爱歌节律。因为转化过程中，Thr－Gly 的侧翼区也同时被整合。序列比较发现 Thr－Gly 下游的几个氨基酸具有种特异性（Wheeler 等，1991），Thr－Gly 区段与侧翼区之间也存在协同进化的现象（Peixoto 等，1993；Nielson 等，1994）。因此，Thr－Gly 及其侧翼区有可能编码种特异性的求爱歌节律（Kyriacou，1990；Hardin 等，1995）。

缺失 Thr－Gly 区段的转化子不能进行正常的温度补偿（Ewer 等，1990）。对 *D.melanogaster* 自然群体的调查也显示出 Thr－Gly 区段具有对昼夜节律起温度补偿的作用（Costa 等，1992；Castiglione-Morelli 等，1995；Sawyer 等，1997）。Thr－Gly 重复对的长度在欧洲和北非 *D.melanogaster* 自然群体中呈现南北纬度梯度分布：北方群体中 $(Thr-Gly)_{20}$ 频率很高，南方则主要是 $(Thr-Gly)_{17}$（Costa 等，1992）。在纬度上，温度变化是主要的。因此温度依赖性的选择可能是 Thr－Gly 长度变异体频率呈纬度梯度分布的维持机制（Costa 等，1992）。随后的蛋白构型研究支持了这一观点（Castiglione-Morelli 等，1995）。最近的实验证实 *D.melanogaster* 自然群体中 Thr－Gly 长度变异体的温度补

偿能力是不同的，从而说明 Thr－Gly 区段可能对昼夜节律的温度补偿机制起着微调作用（Sawyer 等，1997）。

但是，问题并不那么简单。在果蝇 *D. simulans* 自然群体中并未发现类似于果蝇 *D. melanogaster* 的情况（Rosato 等，1994）。Thr－Gly 区段在果蝇 *D. willistoni* 种组内高度保守，并且也未检测到果蝇求爱歌的节律（Gleason 等，1997），在果蝇 *D. nasuta* 亚群中情况也是如此[①]。因此作更大范围的分子进化分析是必要的。最近在哺乳类中克隆了 *per* 的同源基因：*RIGUI*、*hper* 和 *mper*（Sun 等，1997；Tei 等，1997），一个 22 个氨基酸的 Ser－Gly 区段取代了果蝇的 Thr－Gly 区段（Tei 等，1997）。由于 Ser 和 Thr 为相似的氨基酸，因此 Ser－Gly 区段可能具有与 Thr－Gly 区段相似的功能（Kyriacou，1990）。但是除了果蝇，尚未见其他物种这一区段生物学功能的报道。

4　*per* 生物学功能的分子机制

per 基因的突变影响果蝇化蛹周期、活动节律、细胞生长周期、雄性求爱歌节律、心博周期、发育时间及求偶行为（Kyriacou，1990），可见 *per* 基因的主要作用可能是调控生物多种活动的节律。研究得最多的是昼夜节律的分子生物学机制。

通过免疫杂交发现 *per* 的产物丰度具有昼夜周期波动（Siwicki 等，1988；Zerr 等，1990）。随后对果蝇头部 RNA 的检测显示 *per* mRNA 丰度也有周期波动，且比 PER 的丰度早 6～8 h 的相位（Hardin 等，1990）。per^{s} 突变体在正常光暗周期下，mRNA 的相位比野生型提前数小时；而 per^{01} 突变体没有周期波动特征（Hardin 等，1990）。从 mRNA 和 PER 波动周期的相对相差，以及 per^{s} 和 per^{01} 突变体的情况可以看出，*per* RNA 的丰度波动导致 PER 蛋白的丰度波动，而 PER 又反馈调控 *per* 的表达（Hardin 等，1990；Edery 等，1994）。

那么 PER 是如何调控 *per* 的表达呢？利用 *per* 上游区段与报告基因融合的一系列实验表明，*per* RNA 的周期波动是在 RNA 合成水平上调控的，即 PER 调控自身基因的转录（Hardin 等，1992）。PER 蛋白的水平高时，*per* RNA 的水平低，说明 PER 抑制 *per* 的表达（Hardin 等，1995）。

要使这个负调控环呈现 24 h 的周期，关键是精确调节 *per* RNA 和 PER 蛋白的相差。最近发现的生物钟基因 *tim* 就参与了这个调节过程（Sehgal 等，1994；Vosshall 等，1994）。*tim* RNA 和 TIM 自身都有昼夜节律波动（Sehgal 等，1994；Vosshall 等，1994）。最近的实验证明光可以影响 *per* 和 *tim* 的 mRNA 和蛋白水平的周期波动，并且光可以影响 PER－TIM 的结合以及 PER 的磷酸化过程，从而导致 PER 和 TIM 的相移（Lee 等，1996；Myers 等，1996）。

TIM 是通过与 PER 的异型结合，调节 PER 进入核的时间而调节昼夜节律行为的。但是 PER 和 TIM 都缺少 DNA 结合活力，因此也有可能是 PER 通过其 PAS 域与其他含有 bHLH－PAS 域的生物钟基因结合进行负反馈调节的。显而易见，除非 *per* 一直处于开启

① Zheng X-Z, Zhang Y-P, Zhu D-L *et al*, 1998. The Thr-Gly region of the *per* gene is highly conserved in the *D. nasuta* subgroup (submitted).

状态，否则这种负调控回路是难以调制生物节律的。在缺失功能性PER蛋白的突变体中，仍可以观察到*per* mRNA的组成性表达（Zeng等，1994），说明还可能存在PER独立性的正调控因子驱动*per*的转录。最近发现*per*上游有一段69 bp的增强子序列，其中的E-box（enhancer box）是*per* RNA高水平表达所必需的（Hao等，1997）。E-box是bHLH异型二聚蛋白的结合部位，因此可以推测：可能是含有bHLH-PAS域的生物钟基因结合到此位置调节*per*的转录。鼠类生物钟基因*clock*可能就是其中一个同源基因（King等，1997）。最近发现，CLOCK和另一个含有bHLH-PAS域的转录调节因子BMAL1构成异型二聚体，结合到*per*的E-box上驱动*per*的表达（Gekakis等，1998）。在果蝇上的出色工作进一步发现CLOCK-BMAL1异型二聚体结合到*per*和*tim*的E-box上，分别驱动*per*和*tim*的表达。随着PER和TIM的积累，并形成PER-TIM异型二聚体进入核内，阻遏CLOCK-BMAL1与E-box的结合，削减了*per*和*tim*的转录；随着PER和TIM的减少，CLOCK-BMAL1又分别启动了*per*和*tim*新一轮的表达（Darlington等，1998）。这样，正负两个调控回路就精确地驱动了生物节律的主钟摆。这个主钟摆经过一些尚未知的调节RNA和蛋白质稳定性及磷酸化的蛋白的放大作用，生物体的一些外在活动就表现出昼夜节律特征。

5 小结与展望

从上述可以清楚地看到，生物的昼夜节律是由PER和TIM、CLOCK和BMAL1等4个生物钟"齿轮"组成的正负调节回路控制的。它们通过PAS域分别形成异型二聚体进入核内，调节*per*和*tim*的转录，从而使得*per*和*tim* mRNA呈现周期波动。CLOCK自身的周期波动协调了这个过程。光可以影响PER-TIM的结合以及PER的磷酸化过程，从而影响PER-TIM进入核的时间，导致PER和TIM的相移。目前，这个基本钟摆是怎样被放大的，有哪些因子参与了这一放大和协调过程，仍然知之甚少。

对蛾（*A. pernyi*）的研究显示*per* mRNA的周期特征与1个*per*的反义转录产物的周期波动有关（Saumann等，1996）。目前还不清楚这一反义转录物是否直接调节蛾*per* mRNA的周期波动。但可以想像，如果PER在蛾中是主钟摆的话，*per*的反义转录物也就可能是反馈调节回路的一个环节。另外，在果蝇头部还发现了多个具有周期波动特征的mRNA，它们都与*per* mRNA的周期波动同相（Van Gelder等，1995）。其中有一个mRNA的周期特征是PER蛋白依赖性的（Van Gelder等，1996）。这些转录物可能参与生物钟基本钟摆的调节或者放大过程，也可能是生物钟调控的下游蛋白，*crg*-1基因就是后一种（Rouyer等，1997）。由此看来，要鉴定所有生物钟的"齿轮"，并弄清它们的组装机制，还有许多工作要做。

跨越过多个时区的人们都有过这样的经历：不管你如何努力调整，一个内在的生物钟总使你与当地的作息时间格格不入。这个内在的生物钟是怎样起作用的？它能否被及时调整？对于亟待了解这个机制的人们来说，20多年的*per*基因研究是一个漫长的过程。最近几年的研究成果已使人们对生物钟的分子机制有了一个较深层次的了解。那么，这个基本钟摆到底在哪里？我们能否调节它？在一般的生物体内，它可能就在中枢神经里。但是在果蝇里，几乎全身各处都有自主的钟摆（Plautz等，1997），在哺乳动物，它也可能不

仅仅存在于超叉神经核（Sassone-Corsi，1998）。现在还不知道这些钟摆是怎样协调输出的。但我们已经看到不同时刻的光照可以导致 PER 和 TIM 的相移，光刺激人膝关节背面也可以调节生理节律的相位（Campbell 等，1998）。可以相信在不久的将来，睡眠异常、冬季抑郁症患者及飞越多个时区的人们只需用一两片药丸或一束光照就可以调整自己的生物钟（Barinaga，1997；Oren 等，1998）。

从 *per* 的研究我们可以看到：有的复杂行为，其遗传基础却相对简单。也正是基于这个信念，Takahashi 等人才坚持不懈地在哺乳类中克隆了 *clock* 基因（Barinaga，1997）。生物钟分子机制得以理解，体现了遗传学和基因组学相结合的巨大力量。由于重要的生物学功能在进化上都保守，利用各种模式动物进行基因库筛选，将会大大加速解读人类复杂行为分子机制的进程。

参考文献

Barinaga M，1997．New clues found to circadian clocks-including mammals．*Science*，**276**：1030－1031．

Baylies M K，Bargiello T A，Jackson F R *et al*，1987．Changes in abundance or structure of the *per* gene product can alter periodicity of the *Drosophila* clock．*Nature*，**326**：390－392．

Campbell S S，Murphy P J，1998．Extraocular circadian phototransduction in humans．*Science*，**279**：396－399．

Castiglione-Morelli M A，Guantieri V，Villani V *et al*，1995．Conformational study of the Thr－Gly repeat in the *Drosophila* clock protein，PERIOD．*Proc*．*R*．*Soc*．*Lond*．*B*，**260**：155－163．

Citri Y，Colot H V，Jacquier A C *et al*，1987．A family of unusually spliced and biologically active transcripts is encoded by a *Drosophila* clock gene．*Nature*，**326**：42－47．

Colot H V，Hall J C，Rosbash M，1988．Inter-specific comparisons of the *period* gene of *Drosophila*．*EMBO J*，**7**：3929－3937．

Costa R，Peixoto A A，Barbujani G *et al*，1992．A latitudinal cline in a *Drosophila* clock gene．*Proc*．*R*．*Soc*．*Lond*．*B*，**250**：43－49．

Costa R，Peixoto A A，Thackeray J R *et al*，1991．Length polymorphism in the threonine-glycine-encoding repeat region of the *period* gene in *Drosophila*．*J*．*Mol*．*Evol*．，**32**：238－246．

Darlington T K，Wager-Smith K，Ceriani M F *et al*，1998．Closing the circadian loop：CLOCK-induced transcription of its own inhibitor *per* and *tim*．*Science*，**280**：1599－1603．

Dunlap J C，1996．Genetic and molecular analysis of circadian rhythms．*Annu*．*Rev*．*Genet*．，**30**：579－601．

Edery I，Rutila J E，Rosbash M，1994　Phase shifting of the circadian clock by induction of the *Drosophila period* protein．*Science*，**263**：237－240．

Ewer J，Hamblen-coyle M，Rosbash M *et al*，1990．Requirement for *period* gene expression in the adult and not during development for locomoter activity rhythms of imaginal *Drosophila melanogaster*．*J*．*Neurogenet*．，**7**：31－73．

Gekakis N，Saez L，Delahaye-Brown A M *et al*，1995．Isolation of *timeless* by PER protein interaction：defective interaction between *timeless* protein and long-period mutant PER^{L}．*Science*，**270**：811－815．

Gekakis N，Staknis D，Nguyen H B *et al*，1998．Role of the CLOCK protein in the mammalian circadian mechanism．*Science*，**280**：1564－1569．

Gleason J M，Powell J R，1997．Interspecific and intraspecific comparisons of the *period* locus in the *Drosophila willistoni* sibling species．*Mol*．*Biol*．*Evol*．，**14**（7）：741－753．

Hao H，Allen D L，Hardin P E，1997．A circadian enhancer mediates PER－dependent mRNA cycling in *Drosophila*．*Mol*．*Cell*．*Biol*．，**17**（7）：3687－3693．

Hardin P E，Hall J C，Rosbash M，1992．Circadian oscillation in *period* gene mRNA levels are transcriptionally regulated．*Proc*．*Natl*．*Acad*．*Sci*．*USA*，**89**：11711－11715．

Hardin P E，Hall J C，Rosbash，1990．Feedback of the *Drosophila period* gene product on circadian cycling of its messenger RNA levels．*Nature*，**342**：536－540．

Hardin P，Siwicki K K，1995．The multiple roles of *per* in the *Drosophila* circadian clock．*The Neurosciences*，**7**：15－25．

Hilton H，Hey J，1996．DNA sequence variation at the *period* locus reveals the history of species and speciation events in the *Drosophila virilis* group．*Genetics*，**144**：1015－1025．

Huang Z J，Edery I，Rosbash M，1993．PAS is a dimerization domain common to *Drosophila period* and several transcription

factors. *Nature*, **364**: 259 - 262.

Jackson F R, Bargiello T A, Yun S H *et al*, 1986. Product of *per* locus of *Drosophila* shares homology with proteoglycans. *Nature*, **318**: 185 - 188.

King D P, Zhao Y, Sangoram A *et al*, 1997. Positional cloning of the mouse circadian clock gene. *Cell*, **89**: 641 - 653.

Kliman R M, Hey J, 1993. DNA sequence variation at the *period* locus within and among species of the *Drosophila melanogaster* complex. *Genetics*, **133**: 375 - 387.

Konopka R J, Benzer S, 1971. Clock mutants of *Drosophila melanogaster*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.*, **68**: 2112 - 2116.

Kyriacou C P, Hall J C, 1986. Inter-specific genetic control of courtship song production and reception in *Drosophila*. *Science*, **232**: 494 - 497.

Kyriacou C P, 1994. Clock research *per* ring along: it's about time! *Trends in Genetics*, **10** (3): 69 - 71.

Kyriacou C P, 1990. The molecular ethology of the *period* gene in *Drosophila*. *Behavior Genetics*, **20** (2): 191 - 211.

Lee C, Parikh V, Itsukaichi T *et al*, 1996. Resetting the *Drosophila* clock by photic regulation of PER and a PER - TIM complex. *Science*, **271**: 1740 - 1744.

Myers M, Wager-Smith K, Rothenfluh-Hilfiker A *et al*, 1996. Light-induced degradation of TIMELESS and entrainment of *Drosophila* circadian clock. *Science*, **271**: 1736 - 1740.

Nambu J R, Lewise J O, Wharton K A *et al*, 1991. The *Drosophila single-minded* gene encodes a Helix-Loop-Helix protein that acts as a master regulator of CNS midline development. *Cell*, **67**: 1157 - 1167.

Nielson J, Peixoto A A, Piccin A *et al*, 1994. Big flies, small repeats: the "Thr - Gly" region of the *period* gene in *Diptera*. *Mol. Biol. Evol.*, **11**: 839 - 853.

Oren D A, Terman M, 1998. Tweaking the human circadian clock with light. *Science*, **279**: 333 - 334.

Peixoto A A, Costa R, Wheeler D A *et al*, 1992. Evolution of the Threonine-Glycine repeat region of the *period* gene in the *melanogaster* species subgroup of *Drosophila*. *J. Mol. Evol.*, **35**: 411 - 419.

Peixoto A A, Campesan S, Costa R *et al*, 1993. Molecular evolution of a repetitive region within the *per* gene of *Drosophila*. *Mol. Biol. Evol.*, **10**: 127 - 139.

Pittendrigh C S, 1993. Temporal organization: reflection of a Darwinian clock watcher. *Annu. Rev. Physiol.*, **55**: 17 - 54.

Plautz J D, Kaneko M, Hall J C *et al*, 1997. Independent photoreceptive circadian clocks throughout *Drosophila*. *Science*, **278**: 1632 - 1635.

Reppert S M, Tsai T, Roca A L *et al*, 1994. Cloning of a structural and functional homologue of the circadian clock gene *period* from the giant silkmorth *Antheraea pernyi*. *Neuron*, **13**: 1167 - 1176.

Rosato E, Peixoto A A, Barbujani G *et al*, 1994. Molecular polymorphism in the *period* gene of *Drosophila simulans*. *Genetics*, **138**: 693 - 707.

Rouyer F, Rachidi M, Pikielny C *et al*, 1997. A new gene encoding a putative transcription factor regulated by the *Drosophila* circadian clock. *EMBO. J.*, **16** (13): 3944 - 3954.

Sassone-Corsi P, 1998. Molecular clocks mastering time by gene regulation. *Nature*, **392**: 871 - 874.

Saumann I, Reppert S M, 1996. Circadian clock neurons in the silkmoth *Anthraea pernyi*: novel mechanisms of *period* protein regulation. *Neuron*, **17**: 889 - 900.

Sawyer L A, Hennessy J M, Peixoto A A *et al*, 1997. Natural variation in a *Drosophila* clock gene and temperature compensation. *Sciente*, **278**: 2117 - 2120.

Sehgal A, Price J L, Man B *et al*, 1994. Loss of circadian behavior rhythms and *per* RNA oscillation in the *Drosophila* mutant *timeless*. *Science*, **263**: 1603 - 1606.

Sehgal A, Rothenfluh-Halfiker A, Hunter-Ensor M *et al*, 1995. Rhythmic expression of *timeless*: a basis for promoting circadian cycles in *period* gene autoregulation. *Science*, **270**: 808 - 810.

Shin H S, Bargiello T A, Clark B T *et al*, 1985. An unusual coding sequence from a *Drosophila* clock gene is conserved in vertebrates. *Nature*, **317**: 445 - 448.

Siwicki K K, Eastman C, Peterson G *et al*, 1988. Antibodies to the *period* gene product of *Drosophila* reveal diverse tissue distribution and rhythmic changes in the visual system. *Neuron*, **1**: 141 - 150.

Sun Z S, Albrecht U, Zhuchenko O *et al*, 1997. *RIGUI*, a putative mammalian ortholog of the *Drosophila period* gene. *Cell*, **90**: 1003 - 1011.

Takahashi J S, 1995. Molecular neurobiology and genetics of circadian rhythms in mammals. *Annu. Rev. Neurosci.*, **18**: 531 - 553.

Tei H, Okamura H, Shigeyoshi Y *et al*, 1997. Circadian oscillation of a mammalian homologue of the *Drosophila period* gene. *Nature*, **389**: 512 - 516.

Thackeray J R, Kyriacou C P, 1990. Molecular evolution in the *Drosophila yakuba period* locus. *J. Mol. Evol.*, **31**: 389 - 401.

Van Gelder R, Bae H, Palazzdo M *et al*, 1995 Extant and character of circadian gene expression in *Drosophila*

melanogaster: identification of twenty oscillation mRNA in the fly head. *Curr. Biol.*, **5**: 1424－1436.

Van Gelder R, Krasnow M A, 1996. A novel circadianly expressed *Drosophila melanogaster* gene dependent on the *period* gene for its rhythmic expression. *EMBO. J.*, **15**: 1625－1631.

Vosshall L B, Price J L, Sehgal A *et al*, 1994. Block in nuclear localization of *period* protein by a second clock mutation, *timeless*. *Science*, **263**: 1606－1609.

Wang R L, Hey J, 1996. The speciation history of *Drosophila pseudoobscura* and close relatives: inferences from DNA sequence variation at the *period* locus. *Genetics*, **144**: 1113－1126.

Wheeler D A, Kyriacou C P, Greenacre M L *et al*, 1991. Molecular transfer of a species-specific behavior from *Drosophila simulans* to *Drosophila melanogaster*. *Science*, **251**: 1082－1085.

Yu Q, Jacquier A C, Citri Y *et al*, 1987a. Molecular mapping of point mutations in the *period* gene that stop or speed up biological clocks in *Drosophila melanogaster*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **84**: 784－788.

Yu Q, Colot H V, Kyriacou C P *et al*, 1987b. Behavior modification by *in vitro* mutagenesis of a variable region within the *period* gene of *Drosophila*. *Nature*, **326**: 765－769.

Zeng H, Hardin P E, Rosbash M, 1994. Constitutive overexpression of the *Drosophila period* protein inhibits *period* mRNA cycling. *EMBO J*, **13**: 3590－3598.

Zerr D M, Hall J C, Rosbash M *et al*, 1990. Circadian fluctuation of *period* protein immunoreactivity in the CNS and the visual system of *Drosophila*. *J. Neurosci.*, **10**: 2749－2762.

THE MOLECULAR BIOLOGY OF THE BIOLOGICAL CLOCK GENE, *period*

ZHENG Xiang-zhong[①②] ZHANG Ya-ping[①] ZHU Ding-liang[②] GENG Zhen-cheng[②]

(①*Lab. of Cellular and Molecular Evolution, Kunming Institute of Zoology, the Chinese Academy of Sciences, Kunming* 650223)

(②*Institute of Genetics, Fudan University, Shanghai* 200433)

Abstract

Many biochemical, physiological and behavioural processes in organisms ranging from microorganisms to vertebrates exhibit circadian rhythms driven by endogenous oscillators. Since the cloning of the biological clock gene *period* in *Drosophila*, the endeavor in two decades to understand the molecular components that constitute these oscillators has been rewarded: we now know the circadian rhythm is driven by four cogs: PER, TIM, CLOCK and BMAL1, and the mechanism which govern the circadian oscillation has been elucidated. This work on biological clock genes is spectacular not only for its heuristic value, but also because it illustrate the synegistic power of genetics and genomics. Given the evolutionary conservation of the mechanisms that govern the fundermental biological processes, the *period* story will greatly accelerate the reseach progress on human complex behavior.

Key words Biological clock, *period* (*per*) gene